

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/CN05/000387

International filing date: 28 March 2005 (28.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: CN
Number: 200410029590.7
Filing date: 26 March 2004 (26.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 09 May 2005 (09.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2004. 03. 26

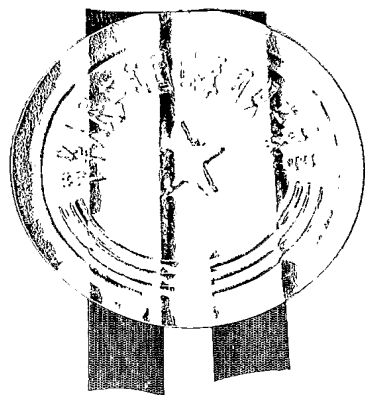
申 请 号： 200410029590. 7

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 一种检测小分子化合物的方法及其专用生物芯片

申 请 人： 北京博奥生物芯片有限责任公司 清华大学

发明人或设计人： 孙义民、邢婉丽、王国青、杜宏武、张荣、陆媛、王艳、程京



中华人民共和国
国家知识产权局局长

王 荣 川

2005 年 4 月 12 日

权利要求书

1、一种检测小分子化合物的生物芯片，包括固相基质和固定在基质上的小分子化合物与载体蛋白的偶联物。

2、根据权利要求1所述的检测小分子化合物的生物芯片，其特征在于：所述载体蛋白为人血清白蛋白、牛血清白蛋白、匙孔血蓝蛋白或卵清蛋白。

3、根据权利要求1所述的检测小分子化合物的生物芯片，其特征在于：所述小分子化合物的分子量为1—10000道尔顿。

4、根据权利要求1所述的检测小分子化合物的生物芯片，其特征在于：所述生物芯片上还固定有空白对照、阴性对照、样品制备参照、芯片固定化学参照和数据归一化参照。

5、根据权利要求1所述的检测小分子化合物的生物芯片，其特征在于：所述固相基质选自经化学修饰的陶瓷、玻璃、石英、多孔硅、尼龙膜、塑料、聚苯乙烯、硝酸纤维膜、金属之一种。

6、根据权利要求1至5任一所述的检测小分子化合物的生物芯片，其特征在于：所述生物芯片按如下步骤制备：

1) 将小分子化合物与载体蛋白偶联；

2) 用自动点样装置将小分子化合物与载体蛋白偶联物分配到经化学修饰的固相基质上；

3) 干燥得到生物芯片。

7、一种检测小分子化合物的方法，包括如下步骤：

1) 用封闭液封阻生物芯片上的非点样区域，所述生物芯片包括固相基质和固定在基质上的小分子化合物与载体蛋白的偶联物；

2) 在生物芯片上的点样区域内加入待测样品或其制备液及小分子化合物特异配体的混合液，进行反应；

3) 通过检测小分子化合物的特异配体，确定小分子化合物是否存在及其含量。

8、根据权利要求7所述的检测小分子化合物的方法，其特征在于：步骤2)中所述的小分子化合物的特异配体为小分子化合物的抗体或能与小分子化合物特异结合的高分子聚合物。

9、根据权利要求7所述的检测小分子化合物的方法，其特征在于：步骤3)中检测小分子化合物的特异配体，是通过结合在小分子化合物特异配体上的偶联物完成检测。

10、根据权利要求 7 所述的检测小分子化合物的方法，其特征在于：步骤 3) 中检测小分子化合物的特异配体，是通过与小分子化合物特异配体特异结合的抗体上的偶联物完成检测。

11、根据权利要求 9 和 10 所述的检测小分子化合物的方法，其特征在于：所述偶联物为荧光分子、酶或生物素。

说明书

一种检测小分子化合物的方法及其专用生物芯片

技术领域

本发明涉及化合物检测方法及其专用设备，特别是涉及一种检测小分子化合物的方法及其专用生物芯片。

背景技术

生物芯片技术是 90 年代中期以来影响最深远的重大科技进展之一，是融微电子学、生物学、物理学、化学、计算机科学为一体的高度交叉的新技术。生物芯片是指采用光导原位合成或微量点样等方法，将大量生物大分子比如核酸片段、多肽分子甚至组织切片、细胞等等生物样品有序地固化于支持物（如玻片、硅片、聚丙烯酰胺凝胶、尼龙膜等载体）的表面，组成密集分子排列，然后与待测生物样品中靶分子反应，通过特定的仪器，如激光共聚焦扫描或电荷偶联摄影像机对反应后信号的强度进行快速、并行、高效地检测分析，从而判断样品中靶分子的数量。根据芯片上固定的探针的不同，生物芯片可以分为基因芯片、蛋白芯片、细胞芯片和组织芯片等，近年来发展起来的芯片实验室也是生物芯片的一个重要分支。

目前，小分子化合物的检测主要有两种方法，即理化分析方法和免疫分析方法。理化分析方法主要包括波谱法、色谱法及其联用技术，其中以色谱法最为常用，如高效液相色谱（HPLC）、气相色谱（GC）、薄层色谱（TLC）等。免疫分析方法包括放射免疫法（RIA）、酶联免疫法（ELISA）、荧光免疫法（FIA）等，其中以酶联免疫法最为常用。

色谱分离体系通常包括被分离组分、固定相和流动相三部分，其原理是根据不同组分在两相之间分配系数的差异，当两相作相对运动时，组分在两相中反复进行分配，随着流动相的流动，达到分离检测的目的。色谱分离法具有分离效能高、选择性好、定性和定量能力强等优点，但也存在明显的不足之处，如样品制备过程复杂，仪器价格昂贵，耗时长等。

小分子化合物的免疫分析是免疫学、分析化学、合成化学相结合的一项技术。ELISA 是免疫分析的经典代表，小分子化合物的 ELISA 检测主要有两种方式：一为包被小分子化合物的抗体，通过酶标小分子完成样品检测；另一为包被载体偶联的小分子抗原，通过酶标抗体完成样品检测。其优点是分析速度快，灵敏度高，检测成本低，缺点是分析效率低，信息量小，只能完成单指标检测。

发明内容

本发明的目的是提供一种检测小分子化合物的方法及其专用生物芯片。

本发明所提供的检测小分子化合物的生物芯片，包括固相基质和固定在基质上的小分子化合物与载体蛋白的偶联物。

常用的载体蛋白为人血清白蛋白（HAS）、牛血清白蛋白（BSA）、匙孔血蓝蛋白（KLH）或卵清蛋白（OVA）；固相基质可以是陶瓷、玻璃、石英、多孔硅、尼龙膜、塑料、聚苯乙烯、硝酸纤维膜、金属中的一种。

为了使检测更加方便可靠，在进行上述生物芯片设计和制备时，还可以同时固定一些参照物，参照物一般包括空白对照、阴性对照、样品制备参照、芯片固定化学参照和数据归一化参照。

本发明所提供的检测小分子化合物的生物芯片，按如下步骤制备：

- 1) 将小分子化合物与载体蛋白偶联；
- 2) 用自动点样装置将小分子化合物与载体蛋白偶联物分配到经化学修饰的固相基质上；
- 3) 干燥得到生物芯片。

上述过程中，小分子化合物和载体蛋白的偶联物按常规方法制备。

本发明所提供的检测小分子化合物的方法，需要使用上述生物芯片，其具体过程如下：

- 1) 用封闭液封阻生物芯片上的非点样区域，所述生物芯片包括固相基质和固定在基质上的小分子化合物与载体蛋白的偶联物；
- 2) 在生物芯片上的点样区域内加入待测样品或其制备液及小分子化合物特异配体的混合液，进行反应；
- 3) 通过检测小分子化合物的特异配体，确定小分子化合物是否存在及其含量。

上述步骤2)中所用到的小分子化合物的特异配体通常为小分子化合物的抗体或能与小分子化合物特异结合的高分子聚合物；所述步骤3)中检测小分子化合物的特异配体，是通过小分子化合物特异配体上的偶联物或与小分子化合物特异配体相结合的抗体上的偶联物完成检测，实际应用中，所述偶联物一般选择荧光分子、酶或生物素等。

本发明是生物芯片技术和免疫分析法的有机结合，主要特点有：（1）多样本：由于采用了微点样技术，使一张芯片可以同时检测多个样品；（2）多项目：一次反应可以对检测样品中的多个项目进行逐一分析；（3）检测结果可靠：通过参照物的设计，基本完成对整个检测流程进行逐步监控，有效地保证了检测结果的可靠性；（4）样品用量极小：每份样品或其制备液只需要十几微升。总之，本发明秉承了生物芯片

通量高、信息量大和免疫分析法操作简单、分析速度快、灵敏度高、检测成本低的优势，克服了色谱法仪器价格昂贵，耗时长和 ELISA 检测分析效率低的缺点。通过本发明，用户可以根据实际需要完成样品中小分子化合物的定性、半定量或定量检测，本发明一般适用于检测分子量为 1—10000 道尔顿的小分子化合物。

附图说明

图 1 为阴性样品检测照片，该阴性样品中恩诺沙星、磺胺和链霉素三种兽药的残留量均低于国家规定的最高残留限量。

图 2 为恩诺沙星阳性样品检测照片，该样品中恩诺沙星的残留量高于国家规定的最高残留限量，而磺胺和链霉素的残留量低于国家规定的最高残留限量。

图 3 为磺胺阳性样品检测照片，该样品中磺胺的残留量高于国家规定的最高残留限量，而恩诺沙星和链霉素的残留量低于国家规定的最高残留限量。

图 4 为链霉素阳性样品检测照片，该样品中链霉素的残留量高于国家规定的最高残留限量，而恩诺沙星和磺胺的残留量低于国家规定的最高残留限量。

检测结果呈阳性的兽药用白框注明，其余样品点为其它兽药样品以及为保证检测结果可靠性而设计的参照点。

具体实施方式

实施例 1、用于兽药残留检测的生物芯片的制备

生物芯片的制备过程如下：

1、用点样缓冲液（40%甘油、60% PBS）将恩诺沙星与 BSA 的偶联物、磺胺与 OVA 的偶联物和链霉素与 OVA 的偶联物及阴性对照、样品制备参照、芯片固定化学参照和数据归一化参照以 1.0 毫克/毫升的蛋白浓度配制成点样液，并转移到点样用 384 孔板中。

上述三种兽药小分子与载体蛋白的偶联方法如下：

恩诺沙星偶联物合成方法：1) 准确称取 1200 毫克盐酸恩诺沙星溶于 1.0 毫升纯水中，加入 2 摩尔/升氢氧化钠溶液调整 PH 值到 6.0，并放入 4 度冰箱预冷 30 分钟。然后加入 DCC 和 NHS 溶液反应 0.5 小时。2) 称取 1.0 克 BSA 溶于 0.2 摩尔/升的磷酸盐缓冲液中，然后逐渐加入步骤 1) 的反应液中 4 度放置过夜。3) 将制备好的全抗原溶液装入透析袋中，用磷酸盐缓冲液透析 5 天，其中换液次数不少于 12 次。然后分装保存在 -20 度。

磺胺偶联物合成方法：1) 准确称取 500 毫克磺胺溶在 50 微升 DMF 中，加入 50 % 戊二醛进行活化并放入 4 度冰箱反应 50 分钟。然后加入碳酸钠溶液继续反应 1 小时，测量 PH 值为 8—9。2) 称取 1.0 克 OVA 溶于 0.2 摩尔/升的磷酸盐缓冲液中，然

后逐渐加入步骤 1) 的反应液中 4 度放置过夜。3) 将制备好的全抗原溶液装入透析袋中, 用磷酸盐缓冲液透析 5 天, 其中换液次数不少于 12 次。然后分装保存在-20 度。

链霉素偶联物合成方法: 1) 准确称取 500 毫克硫酸链霉素溶于 500 微升纯水中, 加入 2.0 克羧甲基羟胺溶解后在室温反应 3 小时。然后加入碳酸钠溶液继续反应 1 小时, 检测 PH 值在 7.5 后加入 600 毫克 DCC 反应 2 小时。2) 称取 1.0 克 OVA 溶于 0.2 摩尔/升的磷酸盐缓冲液中, 然后逐渐加入步骤 1) 的反应液中 4 度放置过夜。3) 将制备好的全抗原溶液装入透析袋中, 用磷酸盐缓冲液透析 5 天, 其中换液次数不少于 12 次。然后分装保存在-20 度。

2、通过自动点样装置将准备好的点样液按照一定的点阵排布方式分配到玻片上。每张芯片包含 10 (5 行×2 列) 个阵列, 每个阵列包含 36 (6 行×6 列) 个样品点, 点间距为 400 微米。每个阵列形成一个独立的反应腔;

3、将点好的芯片进行真空干燥;

4、将芯片进行真空封装, 4℃保存。

通过上述方法制备的生物芯片可以同时样品中的恩诺沙星、磺胺和链霉素进行定性、半定量或定量分析。

实施例 2、通过生物芯片进行兽药残留检测

1、芯片封闭: 取上述制备好的生物芯片, 用 10% 封闭用正常羊血清溶液 37℃ 封闭 30 分钟;

2、芯片的清洗和干燥: 取出芯片放在清洗盒内, 用 PBST 溶液 (含 0.5% 的 Tween-20) 摇床振荡清洗 5 分钟, 然后放在离心机内, 1000rpm 离心 1 分钟, 甩干芯片;

3、一抗反应: 取等体积的待测样品 (或其制备液) 和恩诺沙星、磺胺、链霉素的抗体混合液 (每种抗体的浓度为 1 微克/毫升) 加入到微量离心管中, 混合均匀, 然后吸取 20 微升加到芯片的反应腔内, 37℃ 反应 30 分钟;

4、二抗反应: 用步骤 2 所述的方法清洗和干燥芯片, 然后加入 20 微升荧光标记的羊抗小鼠 IgG (浓度为 1 微克/毫升), 37℃ 反应 30 分钟;

5、芯片扫描和数据处理: 用步骤 2 所述的方法清洗和干燥芯片, 然后进行芯片的扫描和数据处理, 结果见图 1-4。

结果说明: 由于本方法的原理是竞争性免疫分析, 所以芯片样品点信号越弱, 表明样品中该兽药的残留量越高。

通过本发明所述的小分子化合物芯片检测系统, 可以达到的技术指标与国家规定的最高残留限量 (MRL) 的对比如下:

	灵敏度 (ng/g)	线性范围 (ng/g)	MRL (ng/g)
恩诺沙星	1	1~50	100
磺胺	0.5	0.5-20	25
链霉素	5	5-200	200

注：上表中 MRL 的数值取各种样品类型允许的最高残留限量中的最小值。

因为本系统的灵敏度远远高于国家规定的最高残留限量，所以进行实际样品的检测时，需要对样品制备液进行稀释后检测。

对图 1—4 中各兽药小分子的含量说明如下：

	恩诺沙星 (ng/g)	磺胺 (ng/g)	链霉素 (ng/g)
图 1	0	0	0
图 2	200	0	0
图 3	0	50	0
图 4	0	0	400

04-03-25

说明书附图

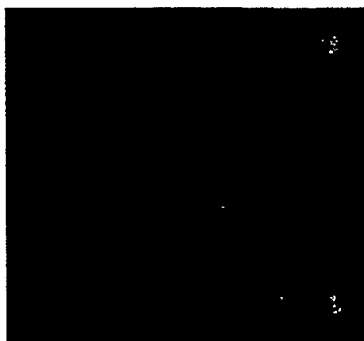


图 1

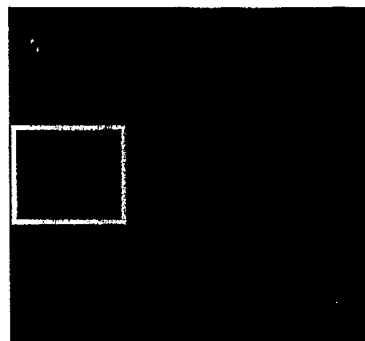


图 2

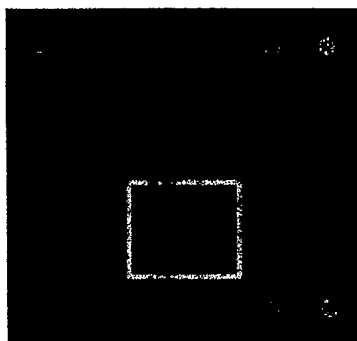


图 3

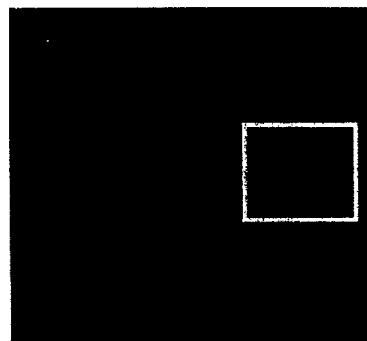


图 4